Hernández Manriquez Nº 13.

FACULTAD DE MEDICINA DE MÉXICO.

BREVE ESTUDIO

Sobre las aplicaciones prácticas

DE LA BACTERIOLOGÍA A LA CLÍNICA

TESIS

Que para
el examen general

De Medicina, Cirugía y Obstetricia

PRESENTA

IGNACIO HERNANDEZ MANRIQUEZ

Alumno de la Escuela Nacional de Medicina.

MÉXICO

Imprenta del Gobierno Federal, en el ex-Arzobispado.
Avenida Oriente 2, núm. 726.

1889

Sr. Dr.
Víctor G. de León

FACULTAD DE MEDICINA DE MÉXICO.

BREVE ESTUDIO

Sobre las aplicaciones prácticas

DE LA BACTERIOLOGÍA A LA CLÍNICA.

TESIS

Que para
el examen general

DE MEDICINA, CIRUGIA Y OBSTETRICIA

PRESENTA

IGNACIO HERNANDEZ MANRIQUEZ

Alumno de la Escuela Nacional de Medicina.

MÉXICO
IMPRENTA DEL GOBIERNO EN EL EX-ARZOBISPADO,
(Avenida 2 Oriente, número 726.)

1889

Mis queridos Padres:

En el momento más crítico de mi vida, hoy que se va á decidir de mi porvenir,
os dedico este mi primer trabajo; aceptadlo
como un débil testimonio de gratitud á vuestros sacrificios por formarme una carrera.

A LOS INTELIGENTES DOCTORES

MANUEL CARMONA Y VALLE Y JOSÉ RAMOS

RECUERDO DE GRATITUD.

Al Distinguido Profesor de Bacteriología

ANGEL GAVIÑO IGLESIAS

En prueba de reconocimiento por su eficaz cooperación en el presente trabajo.

A MIS BENEFACTORES

ETERNO AGRADECIMIENTO.

A los profesores de la Escuela Nacional de Medicina.

Victor:

Acepta este humilde trabajo de tu compañero, haciendo abstraccion de su ningun valor y solo viendo en él una prueba de mi afecto

El autor

INTRODUCCION.

Los incesantes y rápidos progresos que la Ciencia ha efectuado en estos últimos años, han hecho cambiar su faz de una manera radical. De las concepciones abstractas de lo esencial, se ha pasado á lo concreto, se han abandonado las antiguas teorías sobre la producción de los processus morbosus, para llegar por la observación de la naturaleza viva, á la explicación de fenómenos que durante largas centurias se ocultaban bajo el misterioso velo de lo desconocido.

El ser infinitamente pequeño apareció como un Proteo bajo la lente de Lawenhoeck, comenzó á ser ordenado en clasificación por Muller, y llegó á ser conocido como el gran motor de las transformaciones físico -químicas por Davaine y luego por el gran Pasteur que ha llenado el mundo con sus innumerables y bellos descubrimientos.

Enumerar los servicios prestados á la Medicina por la Bacteriología, sería una tarea larga. Nacida ayer, ha hecho palpar ya por sus innegables resultados todo lo que de ella se puede esperar. En esa multiplicidad de aplicaciones, positivas todas, que el médico recaba de la Ciencia Micróbica, descansa precisamente la gran importancia de su estudio.

La necesidad de ella, así como la utilidad que presta, está demostrada por esa atracción que por doquiera ha ejercido, cautivando la atención médica universal, que no hay región adonde no haya llegado el eco de sus conquistas, ni hombre aun el más indiferente, que no sienta el poderoso influjo de esa gran verdad; si profano para admirarlas, si científico para fomentarlas ó combatirlas.

¡Y qué contraste! El ser más pequeño de la Creación, cual es el microbio, ejerciendo la atracción universal de la inteligencia.

En el horizonte de la evolución médica, ninguna idea ha brillado tanto, ni recibido la consagración de tantas inteligencias, ni consumido tantas actividades, ni despertado tanta abnegación, como la idea de estudiar los microbios.

Aquellas opiniones salidas de hombres anteriores á Hipócrates, de que la causa de ciertas enfermedades era la existencia de algunos animalículos del aire; esa hipótesis ante la cual han pasado como ante una momia más de 23 siglos, es hoy robusta y eterna ciencia; ya no es la utopia que permanece inmóvil en medio del torbellino de los sistemas médicos que desfilan con los años para caer y extinguirse en el abismo insondable del olvido. Cual si á incubación tan larga correspondiera desarrollo tan lozano, háse hecho en poco tiempo la indispensable en el conocimiento médico, y gozará vida no efímera, sino vida secular tan larga como la vida de la naturaleza de nuestro planeta.

Contemplemos lo infinitamente pequeño, y descubriremos el vastísimo campo del progreso de la Ciencia Médica, presto ya á dar ópimos frutos á aquel que con positivo entusiasmo y sano criterio lo cultive.

Señores Jurados:

Voy á ocuparme en este trabajo de las aplicaciones prácticas de la Bacteriología á la Clínica, punto hoy de palpitante interés y muy digno de la atención médica universal. Si me hubiera puesto á reflexionar que la suma de conocimientos que requiere lo hacen bien superior á mis pobres fuerzas, lo hubiera desechado desde luego; sin embargo, lo he acogido gustoso, porque me halaga la consideración de que si no lleno mi cometido, al menos fomento una idea cuyo desarrollo ha dado tan bellos resultados á los Pasteur, á los Koch, etc.

Concretaré mi estudio al examen bacteriológico de los líquidos orgánicos evacuados naturalmente ú obtenidos por algún procedimiento especial, haciendo abstracción del mismo estudio en los tejidos orgánicos, por ser esta cuestión más del resorte de la Anatomía patológica que de la Clínica.

En la 1ª parte trataré de los métodos generales de investigación de los micro-organismos, y en la 2ª estudiaré los métodos especiales á ciertas investigaciones.

Si satisfago, en parte al menos, mis propósitos, quedarán cumplidos los deseos de vuestro humilde y S. S.

El Autor.

La investigación de los microbios en los líquidos evacuados naturalmente ú obtenidos por algún procedimiento especial, puede practicarse con ó sin auxilio de reactivos. De aquí resultan pues dos métodos generales.

El 1.er método directo ó examen sin el empleo de reactivos; método de fácil ejecución, pero de aplicaciones muy restringidas.

El 2º más complicado, pero de resultados más satisfactorios, ó examen por medio de los reactivos.

Para el estudio podemos descomponer este último en dos procedimientos:

A. Por medio de un sólo reactivo (que es de aplicación general).

B. Por doble coloración (especial para ciertas investigaciones: Tuberculosis, Lepra, Carbón, Neumonía, etc).

Cada uno de estos procedimientos comprende varios tiempos ú operaciones de cuya estricta observancia depende el éxito de la investigación. Estos son:

1º Manera de recoger los líquidos orgánicos sometidos al examen, y precauciones indispensables.

2º Fijación por desecación, con ó sin calefacción.

3º Aplicación de los reactivos colorantes.

4º Coloración simple ó doble.

5º Deshydratación y transparencia.

6º Líquidos conservadores.

El examen directo de los líquidos, al microscopio y sin reactivos, aunque es un método expedito y sencillo, no deberá preferirse al 2°, siempre que se quiera tener el mayor número de datos ciertos que nos guíen en el diagnóstico de una enfermedad. Puede dar algunas indicaciones útiles respecto á la forma de ciertos microbios: bacillus vibriones, etc., distinguiéndolos de los diversos cuerpos en suspensión en los líquidos. Presenta la ventaja de que se pueden observar los micro-organismos en su agrupación, movimientos y dimensiones exactas, aunque no siempre con suma claridad. Pero los microbios que gozan de movimientos espontáneos ó de movimientos brownianos, se pierden en la preparación y algunos micrococcus son confundidos con las más finas granulaciones grasosas. Por otra parte, la imposibilidad de conservar las preparaciones de esta clase, es un serio inconveniente siempre que se quieran dejar documentados los estudios.

Manera de recoger los líquidos orgánicos.

La recolección de los líquidos orgánicos requiere algunas precauciones que tienen por objeto evitar que gérmenes extraños, depositados en los instrumentos, vasos, utensilios, etc., vengan á mezclarse con aquellos, dando así lugar á interpretaciones erróneas en el examen.

Por regla general: todos los instrumentos y útiles que se empleen, deberán estar perfectamente esterilizados, ya flambeándolos en una lámpara de gas ó de alcohol ó bien colocándolos en una estufa de esterilización á una temperatura de 160° á 200° durante tiempo variable según el caso.

Cuando se quiere depositar un líquido sobre la lámina porta-objeto, se emplea un alambre de platino unido por

una de sus extremidades á una varilla de vidrio y encorvado en su extremidad libre. El alambre debe ser calentado al rojo, inmediatamente antes de cada operación. La lámina deberá también ser esterilizada, flambeándola en una lámpara de gas ó de alcohol.

Si se quiere examinar la sangre, se extrae por una punción que se practica de la manera siguiente: Se lava un dedo de la mano sucesivamente con solución de bicloruro de mercurio al 1 por 1,000; después con alcohol para quitar el exceso del bicloruro, y en fin con éter. Con una aguja bien esterilizada se hace la punción é inmediatamente se recogen con un tubo capilar ó con la asa del alambre de platino las primeras gotas que salen.

Algunos autores recomiendan cubrir el dedo con un poco de colodión, y puncionar á través de la película, de manera que la sangre escurre sobre ésta sin ponerse en contacto con la piel y por lo mismo sin arrastrar los gérmenes adheridos á la superficie cutánea.

Cuando se trata de líquidos que contienen generalmente pocos microbios, como la orina, de suerte que al examinarlos esté uno expuesto á no encontrar ninguno, se pueden emplear reactivos que maten á los microbios en suspensión en el líquido, de modo que por el reposo los cadáveres de estos parásitos se precipitan, reuniéndose en el fondo del vaso en un sedimento que es fácil recoger. Se emplea generalmente el ácido ósmico en solución acuosa al centésimo, se agrega 3 á 5 por 100 de esta solución al líquido, se deja en reposo por 12 ó 24 horas, después se decanta la mayor parte del líquido y se examina el depósito.

En fin, cuando se trata de líquidos no homogéneos, sino que forman varias capas superpuestas, es necesario examinar aisladamente la parte sedimentaria, los grumos, coágulos, etc., que los compongan.

Fijación por desecación con ó sin calefacción.

Cuando se quiere conservar alguna preparación bacteriológica es necesario fijarla antes de colorarla. La fijación se consigue por medio de la desecación que tiene por efecto la retracción de la capa gelatinosa que envuelve generalmente á los microbios, fijándolos así á la lámina sin que su forma sea alterada. Además, cuando se emplea el calor ó el alcohol absoluto para fijar la preparación, se determina la coagulación de la albúmina, lo cual es muy conveniente siempre que se observa la preparación en un medio líquido, como el agua, la glycerina, etc., pues así se evita el despegamiento de la preparación.

La fijación puede hacerse de varios modos:

1° Dejando secar espontáneamente al aire libre, la lámina que contiene la preparación.

2° Sometiéndola á la acción del alcohol absoluto.

3° Calentándola en la flama de una lámpara de gas ó de alcohol.

Si el primer medio de fijación no da el resultado apetecido tan pronto como se desea, se puede sin inconveniente recurrir á la calefacción. Se extiende el líquido que se va á examinar, procurando que la capa sea muy delgada, sobre una lámina cubre-objeto; cuando el líquido es viscoso como los esputos, se le coloca entre dos láminas y se imprime á éstas movimientos circulares de manera de extender siempre el líquido en capa lo más delgada posible. Si se recurre á la calefacción, basta pasar la lámina (la cara que contiene la preparación, arriba) por la flama de una lámpara de gas ó de alcohol por 3 ó 4 veces con alguna lentitud.

El tiempo necesario para la desecación es muy variable. Para un líquido muy fluido y en pequeña cantidad, bastan algunos minutos, mientras que para un líquido espeso, se requiere más tiempo; pero si es albuminoso como la sangre y está en capa muy delgada, la desecación será rápida. Para asegurar la fijación de los microbios conservándoles sus formas, se ha usado también el ácido ósmico, obteniendo buenos resultados. Sin embargo, este tiene como la mayor parte de los ácidos, el inconveniente de oponerse á la fijación de las materias colorantes sobre los microbios y se pierden así gran parte de las ventajas que podría presentar este reactivo, que es á pesar de esto, bien aplicable al estudio de la sangre.

La acción prolongada del alcohol ó del calor hace igualmente perder á los elementos de una preparación, su propiedad de fijación de los colores.

Aplicación de los reactivos colorantes.

El empleo de los reactivos colorantes está fundado en este hecho: que los diversos elementos de un líquido ó tejido orgánico, no fijan con igual tenacidad las materias colorantes con las cuales se les pone en contacto. Así los microbios tienen generalmente más afinidad por los colores y en particular por los de anilina, que los núcleos celulares y éstos más que el protoplasma celular. Si se ponen dos ó más especies de microbios en contacto con una misma sustancia colorante, se observará que mientras unos permanecen indiferentes al reactivo, otros se coloran ligeramente y algunos hay que absorbiendo con avidez el reactivo, saturándose por decirlo así, de color, demuestran su predilección por él.

Con frecuencia sucede que los elementos de un líquido ó tejido orgánico que comunmente se coloran con cierto reactivo, pierden esta propiedad cuando se ha prolongado mucho la acción de los medios físico -químicos de fijación, medios que alterando la composición ó la agrupación molecular de dichos elementos, los hacen ineptos para verificar la combinación química con el reactivo colorante. Es necesario pues tener en cuenta esta causa de error.

La coloración puede hacerse según el caso, *simple ó doble*. No podrían sentarse por hoy reglas generales para el empleo de uno de estos métodos con exclusión del otro, sino en casos muy especiales, pues hasta ahora no se conoce reactivo que colore exclusivamente tal ó cual microbio, y un microbio que en determinadas circunstancias se colora bajo la influencia de un sólo reactivo, en otras no se colorará sino por la acción combinada de dos ó más. Sólo por medio de experiencias y tanteos, más ó menos felices, se ha llegado á determinar para un corto número de micro-organismos, cuáles son de ellos los que requieren doble coloración, y para cuáles basta la simple.

La coloración simple fué la primera empleada. El yodo fué uno de los primeros reactivos que se aplicaron á la técnica bacteriológica.

La fórmula aconsejada por Lugol era:

	Gramos.
Yodo........................	1.20
Yoduro de potasio...............	1.80
Agua........................	30.00

Esta solución da generalmente una coloración amarillenta: pero ciertos microbios muy ricos en materia amyloide se coloran de azul como el "Leptothrix pulmonalis" (al cual muchos autores atribuyen la putrefaccien rápida de los esputos en la bronquitis pútrida.)

A Weigert principalmente se debe la feliz aplicación de los colores de anilina á la técnica bacteriológica, y á Koch que combinó el empleo de estas sustancias con los procedimientos de desecación, la creación del método que lleva su nombre.

Son muchas las materias colorantes de base anilina, pero las que más se usan son las materias *colorantes básicas*, es decir, aquellas cuyo poder colorante depende de la asociación de una base con un ácido, quedando éste indiferente en el acto de la coloración.

Las más empleadas son:

VIOLETA Ó AZUL.

- *Violeta de methyla* (chlorhydrato de trimethyl rosanilina,) se emplea sobre todo el producto que en el comercio tiene la marca: "Violeta 5 B de Bale."
- *Violeta de genciana,* marca B R recomendada por Weigert.
- *Azul de methylena,* más conveniente para las preparaciones que han sido sometidas á la calefacción.

Rojo. Fuchsina (chlorhydrato de rosanilina) Magenta, Fuchsina B.

Amarillo. Crysoidina.

Moreno. Moreno Bísmarck, Moreno de Anilina, Vesuvina.

Verde. Verde de methyla. Este reactivo generalmente impuro, está casi siempre mezclado con un poco de violeta de methyla.

Estos colores no tienen una fórmula química fija, y su composición varía según el modo de preparación cuyo secreto poseen las fábricas.

Preparación de las soluciones colorantes. Con excepción del color moreno, todos los demás colores de anilina

citados, pueden emplearse en solución acuosa; pero á veces se forman precipitados,y por esto es preferible hacer uso de soluciones alcohólicas concentradas (20 á 25 gramos de materia colorante, por 100 de alcohol absoluto), que sirven para preparar el líquido colorante en el momento necesario, agregando 5 ó 6 gotas de la solución alcohólica, al agua destilada contenida en un vidrio de reloj. En estos últimos años se han obtenido mejores resultados alcalinizando las soluciones. Koch que fué el primero que así las empleó en la investigación del "bacillus tuberculosus," hacía uso de esta formula:

Solución alcohólica concentrada de azul methylena.	1
Agua destilada..	200

Después de agitar bien la mezcla agregaba:

Solución de potasa cáustica al 10 por ciento..........	0.2

Esta fórmula y otras análogas, tienen el inconveniente de que no pueden conservarse varios días sin alteración. Ultimamente Koch ha dado otra fórmula que permite conservar la solución inalterable por 10 días, con la condición de que el frasco esté herméticamente tapado.

Esta fórmula se compone de:

	Gramos.
Agua de anilina (5 de anilina por 100 de agua, agítese varias veces, déjese en contacto durante media hora y fíltrese)..	100.00
Solución alcohólica concentrada de violeta de methyla ó fuchsina..	11.00
Alcohol absoluto..	10.00

Método de Gram.—Se prepara una solución de anilina en el agua:

Anilina pura..	1.00
Agua destilada..	24.00

Se agita fuertemente y se filtra.—Se agrega 0.50 centígramos de violeta de genciana finamente pulverizada, se

vuelve á agitar hasta la disolución completa y se filtra por último antes de hacer uso de ella.

Las láminas son introducidas en esta solución por tiempo variable de algunos minutos á una hora. Son lavadas rápidamente y sumergidas en una solución de yoduro de potasio yodurado compuesta así:

	Gramos.
Yodo	1.00
Yoduro de potasio	2.00
Agua destilada	300.00

Permanecen en esta solución hasta que toman un color moreno oscuro; después se les decolora por el alcohol absoluto. El tiempo necesario para la decoloración completa en el alcohol, varía de algunos minutos á 24 horas. Se da transparencia á la preparación por medio de la esencia de clavo y en seguida se monta en bálsamo de Canadá.

Por este método las bacterias se coloran de azul ó violeta, resaltando sobre un fondo incoloro ó débilmente colorido de amarillo.

Método de Erlich.—Este método está fnndado en este hecho: que ciertos micro-organismos y en particular los bacilos de Koch, resisten á la acción del ácido nítrico diluído, una vez que han sido coloridos en soluciones de colores de anilina alcalinizadas, mientras que los demás elementos de la preparación son rápidamente decoloridos en las mismas condiciones.

La solución colorante de Erlich se prepara de la manera siguiente:

A. *Solución acuosa de anilina.*—Como medio alcalino se emplea el aceite de anilina puro. Se calientan 100 gramos de agua destilada á la cual se agregan 10 gramos de aceite de anilina. Se agita la mezcla durante varios minutos. El líquido se enturbia, se hace lactescente; se le deja

en reposo por algunas horas y se filtra cuidadosamente; se tiene entonces una solución límpida é incolora.

B. *Solución alcohólica saturada de materia colorante.*

Se toman 50 gramos de alcohol absoluto ó de alcohol á 90°; se vierte en él, violeta de mithyla 5 B ó de fuchsina en cristales con exceso, es decir, de manera que después de haber agitado bien, aun quede en el fondo del frasco una parte no disuelta. Se deja en reposo y se decanta; es inútil filtrar.

Solución definitiva.—Se toman 100 C. M. C. de la solución A y se agregan 10 de la solución B, se les mezcla bien y se filtra para usarla. Esta solución puede conservarse sin alteración durante 15 días. Se colocan las láminas en esta solución y se dejan en ella por espacio de una hora ó más, según sea necesario.

Al salir del baño colorante se les toma con una pinza esterilizada y se les sumerge en agua destilada para quitar el exceso de materia colorante. En seguida se hace obrar el ácido nítrico de la manera siguiente:

Se prepara de antemano una mezcla de:

Agua destilada............	3 á 5 partes
Acido nítrico puro........	1 parte

Se sumergen las láminas en esta mezcla durante 2 ó 3 segundos, se agitan hasta que ya no den materia colorante.

Al salir del baño se sumergen en alcohol que acaba la decoloración. Terminada esta operación se transparenta la preparación por medio de la esencia de clavo y se agrega una ó dos gotas de una mezcla de bálsamo de Canadá y esencia de trementina para asegurar la conservación.

Doble coloración.

El objeto de la doble coloración es dar al fondo de la preparación un tinte diferente del que se dá á los microbios, logrando de esta manera que éstos resalten á la vista del observador entre la diversidad de los elementos que los rodean. Se ha conseguido este objeto, aprovechando la desigual aptitud que tienen los diversos colores de anilina para fijarse sobre los microbios; singular propiedad, en virtud de la cual un color que primero se ha fijado en todos los elementos de una preparación es expulsado por otro, quedando en último resultado sólo fijo en alguno ó algunos de los microbios que son de su elección.

Los métodos de doble coloración son muy numerosos, pero los más usados son los de Koch, de Erlich, de Gram y de Weigert. Estando todos basados en el mismo principio, bastará describir alguno de estos. El de más aplicaciones es el de Erlich, que se practica de la manera siguiente:

Las láminas son primero coloridas lo mismo que en el procedimiento de simple coloración, ya con violeta de methyla ó ya con fuchsina.

La decoloración se hace por la acción sucesiva del ácido nítrico diluído al tercio y del alcohol, y se procede luego á la segunda coloración. En una cápsula que contiene 100 gramos de agua destilada se vierten de 10 á 15 gotas de una solución saturada da azul de methylena en agua, si los objetos han sido coloridos primero con fuchsina, ó de solución alcohólica saturada de moreno de Bísmarck si se ha dado la coloración con violeta. Los bacilos quedan coloridos de rojo ó de violeta, y el fondo de azul ó de moreno. Este es el procedimiento más usado para la

investigación del bacillus de la lepra y de la tuberculosis. Se comprende que cambiando colores y combinando sucesivamente su acción, se podrían multiplicar indefinidamente los procedimientos.

Deshydratación y transparencia.

Ya sea que se emplee el método de simple coloración ó ya el de doble coloración, y cualquiera que haya sido el reactivo decolorante, es necesario deshydratar bien la preparación. Esto se consigue sumergiéndola en alcohol absoluto, y exponiéndola después al aire hasta la desecación, pudiendo entonces sin más requisito y para concluir, aplicarle los líquidos conservados de que después hablaremos. Sin embargo, como el alcohol tiene una fuerte acción decolorante, se deberá deshydratar por el calor en el caso de preparaciones de líquidos que tienen cierta transparencia ó de cultivos, pues de esta manera los microbios conservan mejor su color.

Transparencia. Cuando se trata de líquidos espesos muy ricos en celdillas, es necesario transparentar la preparación. Para esto se hace uso de las esencias. Las que más se emplean son las de clavo, de trementina, de cedro, de bergamota y el xilol.

La esencia de clavo disuelve los colores de anilina, y puede contribuir á la decoloración de los elementos nucleares. Esto que es una ventaja puede volverse inconveniente si se prolonga demasiado, porque entonces los microbios también se decoloran.

Cuando después de algunos minutos se ha obtenido la transparencia, se quita el exceso de esencia por medio del papel filtro, y se procede á montar definitivamente la preparación, que es lo que se llama Conservación.

Conservación.

Una vez que se ha deshydratado y transparentado la preparación, sólo falta para terminar, aplicarle los medios de conservación. Tres son los que más frecuentemente se emplean: el bálsamo del Canadá, la solución de resina de Damar en benzina y la glycerina. Esta última tan útil para la conservación de las preparaciones histológicas, tiene para las preparaciones bacteriológicas el inconveniente de decolorarlas á la larga.

Por lo demás, tiene la gran ventaja de ser fuertemente refringente y aumentar notablemente la transparencia de los objetos que se observan, pudiéndose distinguir detalles de estructura que no se aprecian con otros líquidos, ventaja que puede utilizarse cuando se estudian tejidos que tienen microbios. Se emplea á veces una mezcla en partes iguales de gelatina y glycerina, mezcla que decolora menos la preparación: es la gelatina glycerinada de Klebs. En todos casos es preferible el bálsamo del Canadá que conserva casi indefinidamente las preparaciones y les da perfecta transparencia. Basta depositar una ó dos gotas de este bálsamo sobre la preparación.

Para darle la fluidez necesaria se le mezcla generalmente con cloroformo; pero es necesario que éste no sea en exceso, porque también decolora la preparación. El benzoilado de Damar se usa de la misma manera que el bálsamo de Canadá.

Procedimientos especiales para ciertas investigaciones.

En esta parte nos ocuparemos de los medios de investigación de los microbios en la sangre, en los esputos, en la orina y en las materias fecales.

Examen de la sangre.

En algunas enfermedades como el tifo, el carbón, etc., el examen microscópico directo de la sangre sin el empleo de reactivos, puede bastarnos para formular un diagnóstico. En otros casos, como en la tuberculosis miliar, el muermo, etc., debemos recurrir á métodos especiales que han sido indicados por Koch y Erlich. El principio de estos métodos está basado en la desecación de la sangre en capa muy delgada lo que altera la forma de sus elementos figurados mientras que los micro-organismos conservan sus formas características.

Las materias colorantes de base anilina que se emplean son las siguientes:

Moreno de Bísmarck, vesuvina, moreno de anilina, fuchsina, azul de methylena, violeta de genciana y violeta de methyla. No se considerará como micro organismo todo lo que se colore con estas sustancias, porque las granulaciones del protoplasma, los núcleos de las celdillas y sus productos de descomposición toman igualmente bien la materia colorante.

Manera de recoger la sangre.—Se elige generalmente uno de los dedos de la mano para extraer la sangre. Se lava primero muy bien con agua común y jabón, después con bicloruro de mercurio (1.1000) en seguida con alcohol que quita el exceso de sublimado y en fin con éter. Se toma una aguja flambeada con el mayor cuidado y se hace una punción en el dedo. La primera gota de sangre que sale se recoge con una aguja de platino previamente flambeada, se deposita sobre una lámina esterilizada con igual cuidado por medio del sublimado, del alcohol y del éter. Se extiende en seguida la gotita en capa tan delgada como

sea posible y se seca pasando la lámina (con la preparación arriba) por 3 veces á través de la flama de una lámpara de gas ó de alcohol. Se procede luego á la coloración. La coloración se da con una solución acuosa de alguna de las materias colorantes de anilina ya citadas. En algunos minutos está colorida. El exceso de materia colorante se quita con agua esterilizada y destilada que se deja escurrir sobre la preparación. Si se quiere conservar en bálsamo de Canadá ó en la esencia de clavo es necesario primero secarla y poner después sobre el porta-objeto una gota de algunos de estos líquidos. Cuando se emplea una solución acuosa concentrada, es necesario una vez colorida la preparación quitar el exceso de materia colorante con el alcohol.

El azul de methylena es preferible porque no da un exceso de coloración aunque las preparaciones hayan quedado largo tiempo en su contacto.

Para quitar el exceso de coloración es bueno servirse de una mezcla de alcohol y glycerina ó ácido acético y agua. La vesuvina, el moreno de Bísmarck y el moreno de anilina no deben ser empleados en soluciones alcohólicas.

El método de Gram es muy recomendable para la investigación de los micro-organismos en la sangre. Las láminas son preparadas como queda dicho, después son sumergidas en una solución de Erlich-Weigert de agua de anilina y violeta de genciana preparada de la manera siguiente: En una probeta bien lavada con agua y alcohol y después de secarla, se mezclan 6 C. M. C. de agua destilada y 10 á 15 gotas de aceite de anilina. Se agita fuertemente y se filtra la mezcla en un filtro humedecido. Al líquido filtrado se agregan algunas gotas de una solución alcohólica de violeta de genciana ó de violeta de methyla preparada así:

En una probeta lavada como queda dicho, se vierten

4 á 5 C. M. C. de alcohol absoluto y se agrega un poco de violeta de genciana ó de violeta de methyla en cristales; la solución debe ser bastante concentrada hasta que un objeto colocado delante de la probeta no sea ya visible por transparencia. Se vierten algunas gotas de este licor en la solución acuosa de anilina ya filtrada hasta que la mezcla enturbie ligeramente; enturbiamiento que debe desaparecer después de algunos minutos de reposo. Pero aun cuando un enturbiamiento ligero persistiera, no tendría inconveniente para el examen. Después que las láminas han sufrido la acción colorante de esta solución, se pasan á una segunda solución compuesta de:

	Gramos.
Yodo....	1.00
Yoduro de potasio..............	2.00
Agua.........................	300.00

dejándolas en ella hasta que se forme un precipitado moreno sucio. Dos ó tres minutos después se pasan á un baño de alcohol absoluto, en donde deben permanecer hasta la decoloración completa.

Todos los elementos figurados aparecen decoloridos, excepto los micro-organismos que han fijado el color azul oscuro.

Para examinar las preparaciones así coloridas, es necesario servirse de los objetivos de inmersión homogénea, y del condensador de Abbe.

El método de Loffler es también muy útil. Las láminas se preparan lo mismo que en los métodos anteriores, se colocan durante 5 ó 10 minutos en un líquido colorante compuesto de 30 C. M. C., de una solución alcohólica concentrada de azul de methylena, y de 100 C. M. C. de una solución débil de potasa; después son lavadas en una solución de ácido acético al medio por ciento tratadas por

el alcohol, secadas y montadas en la esencia de clavo ó el bálsamo de Canadá. Este método es aplicable muy particularmente á la investigación de los bacilos del muermo y del carbón.

Para la investigación de las "*Spirochœte Obermeyeri*" en la fiebre recurrente, se emplea el método de Gunther. Las láminas preparadas según el procedimiento común, se colocan por diez segundos en ácido acético al cinco por ciento á fin de obtener la decoloración de los glóbulos. Se quita el exceso de ácido, colocando la lámina sobre un frasco destapado que contiene una solución concentrada de amoniaco que se agita. En seguida se colora la preparación con la solución de violeta de genciana de Erlich-Weigert. Después se lava la lámina con agua, y por último se monta en bálsamo de Canadá. Para el bacillus de la tuberculosis se emplea el método de Erlich ó el de Koch ya descritos.

Esputo.

Sabemos que el esputo es un producto complexo expulsado de las vías respiratorias por el acto mecánico de la tos, compuesto en su mayor parte de las secreciones de la mucosa respiratoria, mezcladas con más ó menos cantidad de saliva y moco nasal, y accesoriamente con materias extrañas á su composición, y micro-organismos patógenos y no patógenos.

Por lo tanto, el examen microscópico del esputo podrá revelar la existencia de micro-organismos, procedentes no solamente de las vías respiratorias propiamente dichas, sino de la cavidad bucal, de las fosas nasales y aun del hígado (en caso de colecciones hepáticas purulentas ú otras abiertas en los bronquios). A pesar de esta complexidad

del esputo, los caracteres morfológicos de los micro-organismos procedentes de las vías respiratorias propiamente dichas, son bastante marcados (al menos para los estudiados hasta hoy) para que un observador ejercitado pueda por ellos distinguirlos fácilmente de los demás cuerpos que los rodean. Por desgracia todavía hoy no se ha conseguido averiguar para la mayoría de las enfermedades de las vías respiratorias, cuáles de estos micro-organismos gozan de verdadera especificidad como agentes patógenos, pues con excepción del bacillus de Koch que es ya una positiva conquista de la Bacteriología y un dato precioso para el diagnóstico de la tuberculosis, el Pneumococcus de Friedlander en la pneumonía, que está á punto de tomar rango al lado del bacillus de Koch como agente patógeno, y acaso el Leptothrix pulmonalis como agente de la putrefacción en la bronquitis pútrida, de los demás no se tiene más que sospechas.

No me detendré en describir los métodos de investigación del bacillus de Koch por ser ya muy conocidos. Sólo diré, á título de reminiscencia, que todos se fundan en la importante propiedad que tiene el bacillus de la tubèrculosis, de *fijar la materia colorante en solución alcalina, y al contrario de otros micro-organismos patógenos y no patógenos que se encuentran en el esputo, no decolorarse en una solución ácida, ni en el alcohol absoluto.* El método más empleado es el de Erlich.

Bacillus de Friedlander. Friedlander y después Klebs, Eberth y Koch, han señalado la presencia de micro-organismos probablemente específicos en los pulmones, y en los esputos neumónicos. Estos micro-organismos tienen la forma de bastoncillos cortos, algo gruesos, y otras veces la forma de diplococcus. Para buscarlos se hace uso del método de Friedlander, que es muy análogo al de Gunther para la coloración de las espírilas de la sangre.

Las láminas preparadas como ya hemos dicho, se pasan tres veces por la flama de una lámpara de gas ó de alcohol, y se sumergen por algunos minutos en una solución de ácido acético al uno por ciento. Se quita el exceso de ácido, se seca la preparación al aire, y después se coloca por algunos minutos en una solución de violeta de genciana y de agua de anilina saturada. Se lava con agua y se examina. Se puede también emplear el método de Gram

Orina.

La orina como el esputo y como la sangre puede contener micro–organismos. Estos pueden ser también patógenos y no patógenos. Generalmente aquellos se encuentran ya en el momento de ser eliminada la orina; en tanto que los segundos se forman comunmente después de algún tiempo de eliminada ésta y son probablemente la causa de la descomposición amoniacal. Fhilipowicz ha demostrado que los bacilos de la tuberculosis, del muermo, etc., pasan á la orina y Jacksch dice que en las enfermedades infecciosas, la orina recientemente eliminada, sobre todo, si contiene albúmina y cilindros, contiene también micro–organismos en gran cantidad. Dice haber encontradoen los casos de erisipela, cuando esta enfermedad se complica de nefritis aguda, enormes cantidades de hongos que se parecen por su aspecto morfológico al "Streptococcus pyogenus". A la presencia de micro–organismos en la orina se ha llamado Bacteriuria. La investigación del bacillus de la tuberculosis en la orina ha tomado gran importancia bajo el punto de vista del diagnóstico. Los procedimientos de investigación son exactamente los mismos que se emplean para el examen del esputo. La presencia

de estos bacilos indica en la mayoría de los casos una tuberculosis ulcerosa en alguna región del aparato urinario. Sin embargo, esto no debe tomarse como regla absoluta, pues Fhilipowicz dice haber encontrado el bacillus de la tuberculosis en individuos que sufrían de tuberculosis miliar y que sin embargo no tenían ningún foco tuberculoso ulcerado en el aparato génito-urinario. Pero cuando en el curso de una tuberculosis pulmonar ya antigua, se encuentra pus ó albúmina en la orina y bacilos en gran cantidad, es casi seguro que se trata de un processus ulceroso en alguna región del citado aparato. Para examinar la orina es necesario recogerla en vasos bien desinfectados, ya en el momento de ser eliminada ó ya extrayéndola por medio de una sonda esterilizada. Se deposita una partícula del sedimento sobre la lámina porta-objeto y el resto de la operación se hace lo mismo que para el esputo.

Materias fecales.

El examen bacteriológico de las materias fecales presenta importancia por hoy, solamente bajo el punto de vista de la investigación de los bacilos del cólera asiático, de la fiebre tifoidea, de la diarrea verde infantil y del cólera esporádico.

Komma bacillus ó *bacilo vírgula.* Al ilustre bacteriologista de Berlín Roberto Koch, estaba reservado el mérito del descubrimiento del bacillus en una de las enfermedades epidémicas más mortíferas: el *cólera* asiático. Koch describe los bacilos del cólera como bastoncillos cortos, arqueados, un poco más gruesos que los de la tuberculosis. Frecuentemente dos bacilos se adhieren por una de sus extremidades quedando sus curvaturas opuestas,

lo que les da la forma de una S. Algunas veces tomando formas en espiral se asemejan á las espirilas de la fiebre recurrente; pero son sin embargo más gruesos. Koch ha encontrado estos micro-organismos en el canal intestinal y en las materias fecales de los individuos atacados de cólera asiático, pero rara vez los ha observado en los vómitos. Faltan en la sangre, las lágrimas, la saliva, la orina y el aire expirado. Habiendo una enorme cantidad de micro-organismos de varias especies en el canal intestinal, el examen microscópico simple de las materias fecales, puede ser insuficiente para descubrir el "bacillus komma" principalmente cuando existe en muy pequeña cantidad. Para obviar este inconveniente Koch ha ideado varios medios de aislamiento que están basados en el cultivo de los micro-organismos en medios líquidos ó sólidos, cuya preparación y detalles en su empleo requieren trabajos más del resorte de un laboratorio de Bacteriología que de la Clínica; pero como quiera que por hoy son los únicos medios fidedignos en el diagnóstico (para el examen de que nos ocupamos), me veo en el caso de apartarme un poco del programa que había formado para decir unas palabras de estos cultivos.

Los medios de cultivo son líquidos ó sólidos. Los primeros son generalmente caldos, cuya composición ha sido variada de mil maneras, pero cuya base constante es la carne. Los segundos tienen igual composición que los caldos, pero han sido solidificados, gelatinizándolos, es decir, transformándolos en una especie de jalea transparente por la adición de una pequeña cantidad de la gelatina que en el comercio se vende con el nombre de ictyocola ó gelatina nutritiva, ó por el agar-agar. [1]

1 El agar-agar se encuentra en el comercio en placas membranosas, que no son más que una sustancia mucilaginosa extraída de algunas especies de algas marinas comunes en las costas del Japón y cuyo principal representante es la "Gracilaria Lichenoides."

Estas sustancias se disuelven al baño de María, teniendo cuidado de que la temperatura no se eleve más allá de 40° C. para el agar agar ó de 25° C. para la gelatina, porque una temperarura superior acaba por modificarlas, al grado de no solidificarse ya por el enfriamento. Una vez licuadas estas sustancias é incorporadas al caldo, se deja enfriar la mezcla que por enfriamiento se contrae solidificándose, en una jalea transparente muy á propósito para observar el desarrollo y reprodución de los micro-organismos que por inoculación se hayan introducido en ella, pudiendo estudiar por comparación la forma, el color, el poder licuefaciente, etc., de las colonias que se forman.

Un caldo para cultivos puede prepararse de la manera siguiente:

Se hace hervir en un litro de agua 500 gramos de carne de pulpa que sea poco fibrosa y sin mucha grasa. La ebullición debe durar dos horas por lo menos, teniendo cuidado de quitar constantemente la espuma. Se deja después en reposo en lugar fresco hasta el día siguiente. Se filtra, se agrega agua hasta volver á completar un litro. En seguida se adiciona el líquido de 10 gramos de *peptona*, y 2 á 3 por ciento de sal común. Se alcaliniza ligeramente con el carbonato de sosa y se vuelve á hervir y á filtrar para clarificarlo.

Es de suponerse que los vasos, tubos y demás utensilios, lo mismo que el medio de cultivo, deben estar perfectamente esterilizados por el calor, pues de lo contrario se daría lugar á groseros errores y falsas apreciaciones en el diagnóstico. Para los caldos un buen procedimiento de esterilización que no requiere grandes aparatos, es el de calentamiento descontinuo que consiste en poner el caldo al baño de María dos horas diarias por 5 ó 6 días. De esta manera las bacterias adultas que no resisten una temperatura superior á 75° mueren, pero sus esporos resisten, se

desarrollan y al hacerse adultas corren la misma suerte que sus progenitoras. La esterilización puede hacerse por la elevación de la temperatura á 115° C, en un baño de María de cloruro de calcio ó lo que es más seguro, en una marmita de presión de vapor. Basta entonces sújetar el caldo á la acción de los vapores comprimidos, durante dos ó tres horas á 115° para que el medio quede esterilizado y útil para ser extravasado á los matraces ó tubos en donde van á verificarse los cultivos. Los medios de cultivo siempre deben ser ligeramente alcalinos ó neutros, pues los medios ácidos impiden el desarrollo de los micro-organismos.

Veamos ahora cómo se procede á la investigación:

1º Sobre una placa de vidrio perfectameute aséptica se extiende una capa uniforme de gelatina ó de agar-agar que se ha licuado al baño de María; entonces con una gota del líquido que se va á examinar se inocula el cultivo é inmediatamente se cubre todo con una campana de vidrio.

2º Se examinan estas culturas en el microscopio con corto aumento 80 á 100 D y si se encuentran micro-organismos, se observa si en su modo de vegetación son idénticas ó diferentes á las que se han observado en casos bien reconocidos.

3º Se hacen cultivos en celdillas cerradas (porta-objetos excavados que permiten alojar en su excavación cultivos cuyo desarrollo se puede seguir á través de la lámina cubre-objeto) ó en tubos por medio de la gelatina ó del agar-agar.

4º Se inoculan estas culturas á diferentes especies de animales á fin de ver cuáles son las enfermedades que se producen. Si los síntomas que se manifiestan son idénticos á los que se observan en el hombre á consecuencia de la presencia de estos parásitos en su organismo, se puede

afirmar que el microbio de que se trata es el agente de la enfermedad, que vuelto á inocular en un caldo, debe dar un micro-organismo semejante al que sirvió de punto de partida.

Bacillus del cólera nostras.—Finkler y Prior han encontrado en los individuos atacados de cólera nostras bacilos análogos á los Komma-bacillus del cólera asiático. Sin embargo se distinguen de estos por su tamaño, siendo aquellos más largos y más gruesos. Las colonias de bacilos de Finkler-Prior en las culturas en placas sobre gelatina, se presentan bajo formas regularmente redondeadas de contornos delgados, á un débil aumento tienen un aspecto granuloso y un color moreno. Liquidan rápidamente la gelatina produciendo un olor pútrido.

En las culturas en tubos de gelatina peptonizada es fácil distinguir los bacillus del cólera nostras de los Komma-bacillus. Al principio tienen la misma forma; pero cuando se cultivan paralelamente los dos organismos, se ve que el de Finkler se desarrolla con mucha más rapidez y la gelatina es más pronto licuada por él, mientras que en el mismo tiempo la forma característica de clavo que toma la colonia apenas empieza á aparecer para el bacillus de Koch.

Fiebre tifoidea.—Antes de Budd reinaba para la etiología de la fiebre tifoidea la misma oscuridad que para las enfermedades infecciosas en general. Hasta 1856 este autor emitió la idea de un germen contagioso específico, cuyos caracteres biológicos y morfológicos le eran desconocidos. En 1864 Tigri, médico italiano, encontró en las venas pulmonales y en las cavidades izquierdas del corazón de un hombre muerto de fiebre tifoidea numerosas bacterias á las que atribuyó la especificidad. Después vinieron los trabajos de Coze y Feltz de Recklinghausen de Klein de Browicz, etc., entre los cuales había una anarquía com-

pleta; pues ya un micrococcus, ya un bacillus, ya una bacteria eran considerados como los verdaderos agentes patógenos.

Hoy todo el mundo parece de acuerdo en admitir como agente patógeno de la fiebre tifoidea un bacillus y no un micrococcus. Si hay algunas disidencias, es sólo respecto á los más finos detalles de su morfología. Gaffky les atribuye los caracteres siguientes: "Es un bacillus dotado de movimientos propios que se colora mal por los colores de anilina, no licúa la gelatina, y forma esporos terminales." La forma más frecuente, es la descrita por este autor. Es un bastoncillo redondeado en sus extremidades de una longitud de 2 á 0mm·006 y de una anchura de 1 á 0mm 002, es tres veces más largo que ancho. Artaud lo describe con una forma ovoide alargado con un espacio claro en el centro. Pero según Chantemesse este espacio claro no sería debido más que á la retracción del protoplasma por efecto de la calefacción á que se somete la preparación.

Teniendo el bacillus de la fiebre tifoidea muy poca afinidad por los colores y por otra parte estando mezclado en las materias fecales con una infinidad de micro-organismos de otra especie, es indispensable para observarlo recurrir á los procedimientos de aislamiento y cultivo de que hemos hablado ya, en cuyo caso llega á ser colorido por la solución de Magenta con una pequeña cantidad de potasa al 10 por 100.

Diarrea verde infantil. —En 1884 Damaschino demostró que los bacilos son muy abundantes en las evacuaciones de los niños atacados de diarrea verde mientras que desaparecen en los que se curan, en el momento en que las evacuaciones vuelven á tomar su color ordinario. Hayèm y Lesage han verificado la exactitud del hecho.

La coloración verde es debida á una sustancia coloran-

te secretada por el microbio. Este color se hace más intenso después de la evacuación del intestino porque la producción de bacillus es más abundante al contacto del aire. El bacillus penetra en el tubo digestivo con los alimentos. Al estado normal es destruído por el jugo gástrico, pero si, como es frecuente en los niños, una alimentación defectuosa ha provocado dispepsia, el microbio pasa al intestino y provoca la diarrea verde. Las consideraciones fisiológicas han conducido á Hayem á una terapéutica racional de la afección, que consiste en combatir el parásito por los ácidos del jugo gástrico. Después de haber ensayado el ácido chlorhídrico se ha fijado en definitiva en el ácido láctico. Uniendo el uso de este medicamento á medidas higiénicas rigurosas, se cura rápidamente la enfermedad. La cultura del bacillus de la diarrea verde infantíl se hace muy fácilmente en gelatina peptonizada á la cual comunica un linte verde.

La corta exposición que antecede nos hace ver que si es muy reducido el número de las enfermedades de origen microbiótico que puedan reputarse como verdaderas adquisiciones científicas, es más vasto y halagüeño el campo que aun queda por explorar y que tal vez no está remoto el día en que las fiebres eruptivas así como las infecciosas en general y otras muchas cuya etiología es hoy un enigma, vengan á tomar lugar en el nuevo cuadro nosológico como enfermedades microbióticas. [1]

La microscopía clínica y los procedimientos de cultura y aislamiento que día á día se mejoran comprabados por

1 La enfermedad conocida con el nombre de mal del pinto cuya etiología ha sido tan discutida, es hoy según resulta de los trabajos del Dr. Angel Gaviño Iglesias, clasificada entre las enfermedades microbióticas.

la inoculación á varias especies de animales con el fin de ver si el presunto agente morbígeno se reproduce y si la enfermedad que se desarrolla es análoga á la que se observa en el hombre, serán los más poderosos auxiliares para descubrir á nuestros microscópicos enemigos y ponernos en guardia contra sus rudos ataques. Encontrados que sean queda aún una tarea difícil cual es: ensayar con qué armas podrán ser destruídos; tarea que por ardua que sea no raya en lo imposible. Debemos pues intentarlo.

Los métodos de exploración clínica entonces se simplificarán; el diagnóstico, pronóstico y tratamiento ganarán en precisión y por consiguiente la humanidad doliente reportará inapreciables beneficios.

México, Abril 18 de 1889.

Ignacio H. Manriquez.

